




NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE KF

Patent number: JP7097336
Publication date: 1995-04-11
Inventor: KONISHI JINEMON; HAMADA GIICHI
Applicant: NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO
Classification:
- international: A61K45/00; A61K35/12; C07G17/00; A61K31/695; A61K33/00
- european:
Application number: JP19930265589 19930928
Priority number(s): JP19930265589 19930928

Also published as:

 EP0645142 (A1)
 US5560935 (A1)
 EP0645142 (B1)

Report a data error here

Abstract of JP7097336

PURPOSE:To obtain a new physiologically active substance having plasma kallikrein production-inhibitory activity, peripheral blood stream-improving activity, and analgesic, anti-inflammatory and anti-allergic activities.

CONSTITUTION:This physiologically active substance KF is obtained through such processes that an animal or its tissue is inoculated with a virus or oncoocyte as stressor and activated, and an effective factor is extracted from the activated tissue. This substance has pharmacological activities such as plasma kallikrein production-inhibitory activity, restoring and normalizing a dysfunction developed during disease; therefore, having excellent biological function-regulatory/retentive activity. Thus, this substance is highly useful as a medicine such as a peripheral blood stream improver, analgesic, anti-inflammatory agent, anti-allergic agent, etc.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2594222号

(45) 発行日 平成 9 年(1997) 3 月26日

(24) 登録日 平成 8 年(1996) 12 月19日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 45/00 35/12	AAH ABE ABF		A 6 1 K 45/00 35/12	AAH ABE ABF
C 0 7 G 17/00			C 0 7 G 17/00	Z
請求項の数 1 (全 5 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-265589
(22) 出願日 平成 5 年(1993) 9 月28日
(65) 公開番号 特開平7-97336
(43) 公開日 平成 7 年(1995) 4 月11日

早期審査対象出願

(73) 特許権者 000231796
日本臓器製薬株式会社
大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号
(72) 発明者 小西 甚右衛門
東京都武蔵野市吉祥寺東町 3 丁目 21 番 13 号
(72) 発明者 浜田 義一
兵庫県西宮市甲子園町 16 番 11 号
(74) 代理人 弁理士 村山 佐武郎

審査官 鶴見 秀紀

(54) 【発明の名称】 新規生理活性物質-KF

(57) 【整理番号】 1 PC-225

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 活性化組織より抽出した下記性質を有する新規生理活性物質。

(1) 性状：淡黄褐色無定形の吸湿性粉末で 1 mg 中ケイ素類をケイ素換算量として 1~20 μ g を含有する。

(2) 溶解性：水、メタノール、エタノールに可溶
ベンゼン、エーテルに不溶

(3) pH：6.0~8.3

(4) 紫外吸収： λ_{max} = 265~275 nm

(5) 呈色反応：アミノ酸 (ニンヒドリン反応：陽性)
糖 (オルシノール-塩化鉄III-塩酸法：陽性)

リン (モリブデンブルー法：陽性)

蛋白質 (トリクロロ酢酸法：陰性)

フェノール (塩化鉄試験法：陰性)

2

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、内的・外的ストレス一により活性化された組織から抽出した新規生理活性物質に関する。

【0002】

【従来の技術】 生体は内的・外的環境の変化に対応しながら、生体の物理・化学的狀態をある一定の安定な生理的条件内に調節・維持し、個体としての生命を維持している。生体はかかる恒常性を維持し調節するために、種々の物質を常時体内産生すると共に、ウイルスや細菌等の侵入や腫瘍細胞の発生時にはそれらの外的、内的侵襲に対する抵抗物質を併せて体内産生している。

【0003】 しかしながら、何らかの原因でこの生体機能のバランスがくずれ、それが慢性化すると、いわゆる

病態としての各種の疾病が発現することとなる。疾病の理想的治療法は、生体の恒常性維持機能を賦活・調節して、乱れた生体機能の病的インバランスを正常状態に修復させることである。生体機能の維持・正常化は、特に細胞表面の各種リセプターやナトリウム、カリウム、カルシウム等のイオンチャンネルを通じて行われることはよく知られている。加齢に伴って、哺乳動物の細胞ではDNAの損傷修復力が低下することやフリーラジカルの体内産生が老化や膠原病、発癌を促進することが知られており、またコラーゲンは皮膚や血管、軟骨や眼球、腎臓などに広く存在する非細胞物質であるが、加齢と共にコラーゲン質の架橋化が進み弾力を失って硬くなってゆく。糖尿病患者では持続する高血糖の結果、コラーゲン質の過度の架橋化が進み、特に白内障やアテローム性動脈硬化、腎臓疾患、末梢性神経障害などが生ずることはよく知られている。

【0004】本発明者らは、かかる病態時や加齢に伴って生ずる生体の細胞機能不全に伴う神経系や免疫系、内分泌系の歪みを調節し、これを修復する生体の恒常性維持機構に着目し、生体内、特に生体の内的・外的ストレスに対する抵抗期、即ち生体組織の活性化時に産生される物質、生体の自然治癒力を高め、生体の機能正常化に作用する物質を鋭意研究中のところ、本発明を完成した。

【0005】生体内の複雑な機能調節機構の一つとしてカリクレイン・キニン系なる酵素系が知られている。この血漿カリクレイン・キニン系に関しては、生体内では組織に対する傷害や侵害刺激により血液凝固第XII因子が活性化されることによって、一連の酵素反応系が引き起こされると考えられている。即ち、活性化された活性型血液凝固第XII因子は、同じく血漿中に存在する血漿プレカリクレインに作用して、これを活性型酵素の血漿カリクレインに変換し、次いでこの血漿カリクレインが血漿中の高分子キニノーゲンに作用してブラジキニンを遊離させる。

【0006】血漿カリクレイン・キニン系の生成産物であるブラジキニンは、末梢血管拡張、血管透過性亢進、発痛、起炎、白血球の遊走作用など種々の生理活性を有し、発痛、起炎、アレルギー反応誘発のメディエーターとして知られている。従って、過度のブラジキニンの遊離産生を抑制することにより、痛み、炎症、アレルギー症状等を緩和でき、かかる病態状態を正常化することが可能となる。

【0007】前述の如くブラジキニンは血漿カリクレインが高分子キニノーゲンに作用することによって遊離産生されるので、血漿カリクレイン・キニン系におけるカリクレイン生成を阻害して過度のブラジキニンの生成を抑制し正常化する作用物質は鎮痛剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤として使用し得る可能性があり、医薬等として非常に有用性が高い。本発明は各種動物又は動物組織に

ストレッサーとしてのウイルスや腫瘍細胞を接種し組織を活性化させた後、これら活性化組織より新規生理活性物質を抽出したもので、血漿カリクレイン生成阻害活性並びに末梢血流改善作用を有し、病態時に生ずる機能異常を修復し正常化する生体機能の調節・維持物質に関するものである。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、動物の活性化組織より抽出した生理活性物質に関し、末梢血流改善作用、鎮痛、抗炎症、抗アレルギー作用等を有する物質を提供することにある。

【0009】

【課題を解決しようとする手段】本発明物質は、動物の活性化組織を磨砕し、抽出溶媒を加えて組織片を除去した後、除蛋白処理を行い、これを吸着剤に吸着せしめ、次いで吸着成分を溶出することによって得られる生理活性物質である。

【0010】以下に本発明を詳細に説明する。本発明において動物組織とは、ヒト及び各種動物のウイルス感染培養組織、培養細胞及びウイルス感染炎症組織又は孵化鶏卵の漿尿膜等であり、動物組織の活性化に用いるストレッサーとしてのウイルスには、ワクチニアウイルス、牛痘ウイルス、痘瘡ウイルス、エクトロメリアウイルス、サルボックスウイルス等のオルソボックスウイルス、オーフウイルス、パラワクチニアウイルス、ウシ乳頭状口内炎ウイルス等のパラボックスウイルス、ヒツジボックスウイルス、ヤギボックスウイルス、塊皮病ウイルス等のヤギボックスウイルス、ニワトリボックスウイルス、ノウサギ線維腫ウイルス等のトリボックスウイルス、ウサギ粘液腫ウイルス、ウサギ線維腫ウイルス等のウサギボックスウイルス、その他豚痘ウイルス、Yavaサル腫瘍ウイルス、Taraボックスウイルスなどボックスウイルス科に属するウイルス類がある。また、ストレッサーとしての腫瘍細胞にはヒト又は各種動物細胞由来の腫瘍培養細胞株を用いることができ、前記動物、動物組織に接種しうるものであればよい。

【0011】活性化組織を得るための動物としては、ウサギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリ等の家畜・家禽類、或いはサル、ラット、マウス、モルモット、ハムスター等の哺乳動物を用いることができ、用いるストレッサーの種類や目的に応じて適宜選択できる。又、培養細胞としては、使用するストレッサーが増殖可能な培養細胞であればよく、例えば、ヒト血球や胎盤等の各種組織並びに上記動物並びにそれら胎児の腎臓、皮膚、肺臓、睪丸、肝臓、筋肉、副腎、甲状腺、脳、神経細胞、血球など各組織の培養細胞が挙げられる。

【0012】これら活性化組織を無菌的に採取して磨砕し、その1乃至5倍量の抽出溶媒を加えて乳化懸濁液とする。抽出溶媒としては、蒸留水、生理食塩水、弱酸性乃至弱塩基性の緩衝液などを用いることができ、グリセ

リン等の安定化剤、フェノール等の殺菌・防腐剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム等の無機塩類などを適宜添加してもよい。この時、凍結融解、超音波、細胞膜溶解酵素又は界面活性剤等の処理により細胞組織を破壊して抽出を容易にすることができる。

【0013】得られた乳状抽出液を濾過又は遠心分離して組織片を除去した後、除蛋白処理を行う。除蛋白は、公知の方法により実施でき、加熱、超音波、蛋白質変性剤、例えば、酸、塩基、尿素、グアニジン、有機溶媒、界面活性剤等による処理、等電点沈殿、塩析等の方法を適用することができる。次いで、濾紙（セルロース、ニトロセルロース等）、グラスフィルター、セライト、ザイツ濾過板等を用いた濾過、限外濾過、ゲル濾過、イオン交換樹脂、遠心分離などにより析出してきた不溶蛋白質を除去する。

【0014】こうして得られた抽出分画を、塩酸、硫酸、臭化水素酸等の酸を用いて酸性、好ましくはpH 3.5乃至5.5に調整し、吸着剤への吸着操作を行う。使用可能な吸着剤としては、活性炭、カオリン、イオン交換樹脂などを挙げることができ、抽出液中に吸着剤を添加し攪拌するか、吸着剤を充填したカラムを通過させることにより、有効成分を吸着させることができる。

【0015】吸着剤より、本発明物質を溶出するには、前記吸着剤に抽出溶媒、例えば塩基性水溶液又はアルコール等の水混和性溶媒或いはこれらの混合溶液を加え、好ましくはpH 9乃至12として室温又は適宜加熱して或いは攪拌して溶出し、濾過等の通常の方法で吸着剤を除去して達成できる。次いで必要に応じて、クロマトグラフィー、限外濾過法、逆浸透濾過法等を用いた透析法など慣用の方法を利用または脱塩処理することによって、より精製した本発明生理活性物質を得ることができる。

【0016】本発明生理活性物質中に含有されるケイ素類は、水溶性のケイ酸又はケイ酸塩が重合したケイ酸ポリマー体であり、これらはオルトケイ酸、メタケイ酸、メソニケイ酸、メソ三ケイ酸、メソ四ケイ酸等のケイ酸やそれらのナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩などが単体又はポリマー化した形で存在することができ、本発明物質中ケイ素換算量として1乃至20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、好ましくは1.5乃至15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ を含有する。以下は、本発明物質の製造方法の実施例である。但し、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0017】

【実施例】

実施例1. 健康な成熟家兎の皮膚にワクチニアウイルスを接種し、活性化させた後、活性化した皮膚を無菌的に剥出し、これを細切して水を加え、ホモゲナイザーで磨砕し乳状物とした。次いでこれを加圧濾過し、得られた濾液を塩酸でpH 5.0に調整した後、流通蒸気下10

0℃で加熱処理した。濾過して除蛋白した後、水酸化ナトリウムでpH 9.1とし、さらに100℃で加熱処理した後濾過した。濾液を塩酸でpH 4.1に調整し、活性炭2%を加えて2時間攪拌した後濾過した。濾液は更に活性炭5.5%を加えて2時間攪拌した後濾過した。最初に濾取した活性炭に水を加え、水酸化ナトリウムでpH 9.9とし、60℃で1.5時間攪拌した後濾過した。最初の活性炭及び次の活性炭に水を加え、水酸化ナトリウムでpH 10.9とし、60℃で1.5時間攪拌した後濾過した。濾液を合わせ塩酸で中和した後、分子量100の逆浸透濾過膜を用いて脱塩処理を行い、減圧下に乾固した。活性化皮膚1kgからの収量は3gであった。このような方法により製造された本発明生理活性物質は以下の性質を有するものである。

【0018】(1) 性状：淡黄褐色無定形の吸湿性粉末で1mg中ケイ素類をケイ素換算量として2~10 μg を含有する。

(2) 溶解性：水、メタノール、エタノールに可溶、ベンゼン、エーテルに不溶

(3) pH：7.5

(4) 紫外吸収： $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$

(5) 呈色反応：アミノ酸（ニンヒドリン反応：陽性）糖（オルシノールー塩化鉄III-塩酸法：陽性）

リン（モリブデンブルー法：陽性）

蛋白質（トリクロロ酢酸法：陰性）

フェノール（塩化鉄試験法：陰性）

【0019】実施例2. C3HマウスにL細胞（マウス肉腫細胞）を皮下に移植し、10日後にワクチニアウイルスを同部位に接種した後、その5日後に腫瘍炎症部位を摘出した。摘出組織100gを細切した後、pH 7.0で緩衝化した70%グリセリン溶液を加え、ワーリングブレンダーで磨砕し、凍結融解操作を3回行った。乳状の磨砕液を2000 $\times \text{g}$ で1時間遠心し、沈殿を除去した後、上清のpHを5.0に調整し、100℃に加熱し濾過した。濾液をpH 9.0に調整し、再度100℃に加熱し濾過して不溶物を除去した。冷却後濾液をpH 4.5に調整し、活性炭を充填したカラムに通し、蒸留水で洗浄した後、N/25アンモニア水で溶出した。実施例1と同様に中和、脱塩処理等を行った後、減圧下に乾固することによって粉末状の目的物を得た。このような方法により製造された本発明生理活性物質はケイ酸類をやや多く含み、吸湿性粉末の1mg中ケイ素類をケイ素換算量として5~14 μg を含有する。

【0020】

【作用】次に、本発明生理活性物質の薬理作用について述べる。

(1) 血漿カリクレイン生成阻害作用

血漿カリクレイン生成に対する本発明生理活性物質の阻害作用を文献記載の方法に従って測定した。〔「基礎と臨床」第20巻、第17号、399-405頁（198

6)]

即ち、生理食塩水で希釈した正常ヒト血漿にカオリン懸濁液を加え、一定時間後にリマ豆トリプシンインヒビターを添加してカリクレインの生成反応を停止させた後、生成したカリクレインを合成基質D-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilineを用いて定量する系に被検物質を共存させておくことにより、該被検物質のカリクレイン生成阻害活性を求めた。

【0021】結果の一例を表1に示す。活性の強さを血漿カリクレイン生成を50%阻害する濃度 (IC₅₀) を用いて示した。

【表1】

被検物質	IC ₅₀ (μg/ml)
本発明物質	35
インドメタシン	370
ケトプロフェン	400
イブプロフェン	700
ベンタゾシン	1600

20

*

	低温負荷解除後15分の後肢平均皮膚温 (℃)
無処理群	27.3 ± 0.8
対象群：キノホルム処置	24.1 ± 0.3
本発明物質投与群：	
50mg/kg	25.7 ± 0.3
100mg/kg	26.2 ± 0.7

【0024】

【効果】表1の結果から明らかなように、本発明生理活性物質は非常に優れた血漿カリクレイン生成阻害作用を有する。前述したように血漿カリクレインは高分子キノノーゲンに作用してブラジキニンを遊離産生させ、このブラジキニンは末梢血管拡張、発痛、起炎、アレルギー反応誘発のメディエーターとして知られている。即ち、血漿カリクレインの生成を阻害することによってブラジキニンの遊離を抑制できるため、優れた血漿カリクレイン生成阻害活性を有する本発明物質は、例えば鎮痛剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤などの薬剤として非常に有用性が高い。また本発明生理活性物質の薬理活性について *in vitro* 及び *in vivo* の種々の試験系を用いて試験した結果、本発明物質は優れた末梢血流改

* 【0022】 (2) 末梢循環障害改善作用

本発明物質の異常知覚改善作用の指標として、キノホルムによる末梢血液循環障害の改善作用を測定した。即ち、ラットにキノホルムを漸増的に27日間腹腔内投与して末梢循環障害を惹起させた後、後肢を5℃の水に2分間浸漬して低温負荷を与え、その後肢温度回復過程をサーモグラフィーで画像解析することによって末梢循環障害改善作用を評価した。本発明物質はキノホルム投与21日目より7日間連続静脈内投与した。

【0023】結果の一例を表2に示す。

【表2】

善、鎮痛、抗炎症、抗アレルギー等の薬理作用を有することが示された。

【0025】本発明生理活性物質は、医薬用の各種担体若しくは希釈剤と適宜組み合わせ通常の方法によって各種製剤化可能で、経口又は非経口投与のための固体、半固体、液体又はエアロゾル等の剤形に処方することができる。処方にあたっては、本発明物質を単独で用いるか、あるいは他の医薬活性成分と適宜組み合わせで処方してもよい。注射剤としては、水性溶剤又は非水性溶剤、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、リンゲル液、植物油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸エステル、プロピレングリコール等の溶液若しくは懸濁液とし、pHを調整し、等張化することができる。

【0026】経口投与製剤としては、そのままあるいは

適当な添加剤、例えば乳糖、マンニット、トウモロコシデンプン、結晶セルロース等の慣用の賦形剤と共に、セルロース誘導体、アラビアゴム、トウモロコシデンプン、ゼラチン等の結合剤、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、カルメロース、カルメロースカルシウム等の崩壊剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム等の

滑沢剤、その他増量剤、湿潤化剤、緩衝剤、保存剤、香料等を適宜組み合わせることで錠剤、散剤、顆粒剤或いはカプセル剤とすることができる。また患者の状態や疾患の種類に応じて、その治療に最適な上記以外の剤形、例えば坐剤、吸入剤、エアゾール剤、軟膏、パップ剤、点眼剤等に適宜製剤化することが可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// A 6 1 K 31/695
33/00

A 6 1 K 31/695
33/00

()

O